

Instituto de Hematología e Inmunología

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA LEUCEMIA AGUDA PROMIELOCÍTICA: RESULTADOS PRELIMINARES

Dra. Gisela Martínez Antuña,¹ Lic. Niubys Cayado Gutiérrez,¹ Lic. Adriana Muñiz Fernández,¹ Dr. Edgardo Espinosa Martínez,¹ Dra. Elvira Dorticós Balea,¹ Dr. Alejandro González Otero,¹ Dr. José Carnot Uría,² Dr. Oscar Fernández Ramos³ y Dr. Porfirio Hernández Ramírez¹

RESUMEN

La leucemia aguda promielocítica (LAP) se caracteriza por la presencia de la translocación recíproca t (15;17) que tiene como resultado la formación del gen híbrido PML-RAR α . Como la LAP se considera una emergencia hematológica y además tiene hoy en día un tratamiento muy específico con ácido retinoico (ATRA), es muy importante hacer un diagnóstico rápido y preciso, que en muchos casos permite incluso salvar la vida del paciente. En la actualidad se han desarrollado métodos de RT-PCR para detectar el gen híbrido PML-RAR α . Estas técnicas moleculares han sido extremadamente útiles en el diagnóstico de esta entidad. En este trabajo presentamos los resultados preliminares del diagnóstico molecular en 38 pacientes con LAP. En 36 pacientes se demostró la presencia del gen híbrido y 2 fueron negativos. Del total de enfermos con resultados positivos, 19 (55 %) fueron bcr 1, 2 (5 %) fueron bcr 2 y 14 (40 %) fueron bcr 3. Todos los pacientes con resultados positivos respondieron al tratamiento con ATRA. En 1 de los 2 pacientes con resultados negativos se demostró la presencia de la t(11;17). Ninguno de estos 2 enfermos respondió al tratamiento con ATRA.

Descriptor DeCS: LEUCEMIA PROMIELOCITICA AGUDA/diagnóstico.

La leucemia aguda promielocítica (LAP), M3 según la clasificación FAB (Grupo Franco-Americano-Británico),¹ es uno de los subtipos más comunes de las leucemias mieloides agudas (LMA) y constituyen del 10 al 15 % de los casos en

adultos jóvenes.² Varios estudios recientes han demostrado un aumento relativo en la frecuencia de LAP en algunas poblaciones de Europa, África y América Latina que van desde el 17 al 58 % de las LMA en niños hasta del 22 al 37 % en el adulto.^{3,4} En la

¹ Instituto de Hematología e Inmunología.

² Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras".

³ Hospital Militar "Carlos J. Finlay".

mayoría de los pacientes con esta leucemia se observa la translocación recíproca entre los cromosomas 15 y 17: t(15;17)(q22;q11-21). Como resultado de la t(15;17) en el cromosoma 15 se interrumpe el gen PML, previamente desconocido, y en el cromosoma 17 se interrumpe el gen de la cadena α del receptor del ácido retinoico (RAR α). El RAR α pertenece a la superfamilia de los receptores de hormonas y actúa como un factor de transcripción regulado por el ácido retinoico (AR), mientras que el PML recientemente se ha demostrado que forma parte de un complejo multiproteico llamado cuerpo nuclear (*nuclear body*). Estos cuerpos nucleares tienen un papel importante en el control del crecimiento celular y se ha sugerido que la desregulación de algunos de sus componentes puede tener importancia en el desarrollo de neoplasias.⁵

Como resultado de la translocación, se sintetizan las proteínas híbridas PML-RAR α y su recíproca RAR α -PML. La primera se detecta en todos los casos de LAP, mientras que la segunda sólo en un 70-80 % de estos. Hoy en día se plantea que la proteína híbrida PML-RAR α desempeña una función importante en la patogénesis de la LAP porque al provocar la disrupción de los cuerpos nucleares interfiere con el proceso normal de apoptosis. Esto tiene como consecuencia un aumento en la supervivencia de las células

y de esta manera promueve el proceso leucemogénico.⁵

Los estudios citogenéticos iniciales sugirieron que la t(15;17) se encontraba presente en todos los casos morfológicamente diagnosticados como LAP. Hoy en día se sabe que existen casos raros de LAP con otras translocaciones balanceadas que también involucran al RAR α . Las translocaciones alternativas asociadas con LAP descritas hasta el momento se resumen al pie de la página.

Datos recientes sugieren que las proteínas PLZF y NPM, al igual que la PML, puedan tener actividad supresora de crecimiento y que la NuMA interviene en el proceso de formación del huso mitótico en la división celular. Aunque el número de pacientes con estas translocaciones es hasta el momento muy pequeño, los ensayos de diferenciación y los datos clínicos sugieren que los reordenamientos NPM-RAR α y NuMA-RAR α responden al tratamiento con ATRA como el PML-RAR α y contrariamente a lo que sucede con el PLZF-RAR α .⁵

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA LAP

Esta enfermedad tiene una serie de características que hacen que se considere una emergencia hematológica y enfatizan la necesidad de un diagnóstico rápido y preciso. En la actualidad está muy claro que

| <i>Translocación</i> | <i>Oncogenes</i> | <i>Respuesta al ATRA</i> |
|----------------------|-------------------|--------------------------|
| t(15;17)(q22;q 21) | PML-RAR α | Responde |
| t(11;17)(q23;q21) | PLZF-RAR α | Resistente |
| t(11;17)(q13;q21) | NuMA-RAR α | Responde? |
| t(5;17)(q32;q21) | NPM-RAR α | Responde? |

la LAP requiere un tratamiento muy específico en comparación con otros tipos de LMA. Esto se debe al riesgo de muerte por hemorragia y al gran riesgo de recaída asociada con una baja supervivencia si estos enfermos no se tratan con ATRA en combinación con quimioterapia. El subgrupo de pacientes con LAP que se benefician del tratamiento con ATRA está definido por la presencia del gen quimérico PML-RAR α . Por lo tanto, establecer la presencia del reordenamiento PML-RAR α en pacientes en los que se sospeche una LAP, es crítico para el manejo óptimo del paciente.^{5,6}

En la mayoría de los pacientes la presencia indirecta del PML-RAR α está indicada por la detección de la t(15;17). Sin embargo, en la actualidad se sabe que en algunos pacientes en los cuales se detecta por técnicas moleculares el gen PML-RAR α , no se observa la translocación por técnicas citogenéticas. Esto puede deberse a fallos en la técnica citogenética, a inserciones submicroscópicas en las cuales los cromosomas 15 y 17 tienen citogenéticamente una apariencia normal, o a aberraciones cromosómicas complejas que involucran varios cromosomas. Según los datos más recientes, en el 15 % de los pacientes con LAP no se detecta la t(15;17) por los métodos citogenéticos convencionales, de los cuales el 9 % representa fallos citogenéticos, el 4 % eventos de inserciones y el 2 % es debido a aberraciones cromosómicas complejas. Sin embargo, diversos ensayos clínicos demostraron que los pacientes con el reordenamiento PML-RAR- α y resultados citogenéticos normales, reaccionan favorablemente con el mismo tratamiento que aquellos con la t(15;17) clásica.⁵

Varios grupos de investigadores han desarrollado métodos de RT-PCR (reverso

transcripción y reacción en cadena de la polimerasa) para detectar el gen híbrido PML-RAR α . Estas técnicas moleculares han sido extremadamente útiles en el diagnóstico rápido de esta entidad y también en la detección de la enfermedad mínima residual (EMR) durante el tratamiento y seguimiento de estos pacientes.⁶⁻¹⁰

Los estudios moleculares han demostrado que existen 3 puntos de ruptura dentro del gen PML: el bcr 1 (situado en el intron 6) cuya frecuencia es de aproximadamente 60 %, el bcr 3 (situado en el intron 3) cuya frecuencia aproximada es de 33 % y el bcr 2 (situado en posiciones variables del exon 6) que constituye el resto de los casos. El punto de ruptura en el RAR α es siempre el mismo.⁵

Por todo lo anteriormente expuesto, es indudable que es muy importante realizar un diagnóstico rápido y preciso de esta entidad, por lo que el objetivo de nuestro trabajo fue estandarizar el diagnóstico molecular de la LAP en nuestro laboratorio. A continuación presentamos los resultados del estudio inicial de nuestros pacientes con LAP.

MÉTODOS

Se estudiaron muestras de médula ósea de 38 pacientes con LAP (15 masculinos y 23 femeninos) evaluados en el Instituto de Hematología e Inmunología de La Habana. El rango de edad fue de 4 a 75 años. El diagnóstico de LAP se hizo según el criterio de la clasificación FAB utilizando técnicas citomorfológicas y citoquímicas.¹¹

Para realizar el diagnóstico molecular las células mononucleadas se purificaron en un gradiente de Ficoll-Telebrix y posteriormente se suspendieron en una solución de tiocianato de guanidino (GTC)

y se guardaron congeladas a -80 °C hasta la purificación del ARN. El ARN se purificó por el método fenol-guanidinio y se guardó a -80 °C hasta su posterior amplificación.¹²

TÉCNICAS DE RT-PCR DEL PML-RAR α

Se realizó la RT-PCR según el método de la Biomed.¹² Se utilizó un estuche comercial (Promega). Para la reverso-transcripción (RT) se colocó 1 mg de ARN total de la muestra de LAP en un volumen de 20 μ L de *buffer* que contenía 2,5 U de reverso transcriptasa (Mo-MLV), *random hexamers* como "amplímeros", *buffer* 5X, dNTP, DTT, inhibidor de RNasa según las condiciones del fabricante. La reacción se realizó durante 60 min a 42 °C, después 5 min a 99 °C y 5 min a 4 °C.

Posteriormente se tomaron 2 μ L de esta solución y se diluyeron con el *buffer* de PCR que contenía 1,5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8,3, 200 μ mol/L dNTP, 1 U de Taq polimerasa y 10 pmol/ μ L de primers. El volumen final de la reacción fue de 50 μ L.

Después de una desnaturalización inicial de 1 min a 94 °C, se realizó un ciclo de desnaturalización, fortalecimiento (*annealing*) y extensión de 1 min cada uno con las temperaturas de 94, 65 y 72 °C, respectivamente. Este ciclo se repitió 35 veces. De esta primera reacción, se tomó 1 μ L y se realizó una segunda amplificación (*nested*) con las mismas condiciones, pero con los oligonucleótidos adecuados según el punto de ruptura.

Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes:

- M7: CTG CTG GAG GCT GTG GAC.
- M5: AGC GCG ACT ACG AGG AGA T.
- M3: TCA AGA TGG AGT CTG AGG AGG.
- M2: CAG TGT ACG CCT TCT CCA TCA.
- R4: GCT TGT AGA TGC GGG GTA GA.

- R9: CTG CTG CTC TGG GTC TCA AT.
- R6: GCC CAC TTC AAA GCA CTT CT.

Para los puntos de ruptura bcr 1 y bcr 2:

- M2 y R4 se utilizan en el primer PCR y M3 y R9 se usan en la segunda amplificación (*nested*).

Para hacer la reacción de comprobación de bcr1 y bcr 2 (*shifted*), se utilizan M3 y R6. La reacción de comprobación se realizó en los casos al diagnóstico.

Para el punto de ruptura bcr 3:

- M7 y R4 son los del primer PCR y M5 y R9 son los de la segunda amplificación (*nested*).

Para hacer la reacción de comprobación del bcr3 (*shifted*), se utilizan los M5 y R6. La reacción de comprobación se realizó en los casos al diagnóstico.

Como control interno de la reacción se amplifica un segmento del exon 2 del gen RAR α con los siguientes oligonucleótidos:

- R5: CCA CTA GTG GTA GCC TGA GGA CT.
- R2: GCT CTG ACC ACT CTC CAG CA.

Para la determinación de PLZF-ATRA se utilizaron los siguientes oligos:¹³

- Oligo A: GAC AAT GAC ACG GAG GCC AC.
- Oligo F: GGC TTG TAG ATG CGG GGT AG.
- Oligo C: AAC CAC AAG GCT GAC GCT GT.

Los oligos A y F se utilizan en el primer PCR y para el segundo PCR (*seminested*) se utilizan C y F.

Finalmente 15 μ L del segundo PCR (*nested*) se colocaron en electroforesis en

un gel de agarosa al 3 %. Las bandas se colorearon con bromuro de etidio y se visualizaron bajo una lámpara UV. En todos los casos se realizó siempre un control negativo (los reactivos + H₂O) y un control positivo conocido según el punto de ruptura que se estuviera analizando.

RESULTADOS

El resultado del estudio molecular mostró que de los 38 pacientes estudiados, 36 tuvieron resultados positivos y 2 mostraron resultados negativos para todos los puntos de ruptura.

Del total de 36 enfermos con resultados positivos, 19 (55 %) fueron bcr 1, 2 (5 %) fueron bcr 2 y 14 (40 %) fueron bcr 3.

Un paciente con un diagnóstico morfológico dudoso entre M3 y M4 mostró la presencia del gen híbrido PML-RAR α , lo que confirmó el diagnóstico de LAP.

Todos los pacientes con resultado positivos respondieron al tratamiento con ATRA.

De los 2 pacientes con resultados negativos para el estudio del PML-RAR α , uno fue positivo para la t(11;17) (PLZF-RAR α). Al otro paciente no se le pudo realizar el estudio de otras translocaciones. Estos enfermos no tuvieron respuesta al tratamiento con ATRA.

DISCUSIÓN

La LAP constituye una emergencia hematológica, por lo que un diagnóstico rápido y preciso es esencial. Todos los estudios realizados hasta el momento demuestran la importancia de la técnica molecular como complemento del análisis citogenético convencional en aquellos pacientes donde se sospeche una LAP, para identificar rápidamente al subgrupo de pacientes que se benefician del tratamiento

con ATRA. Por otra parte, los ensayos clínicos realizados han demostrado que los pacientes con cariotipo normal, en los cuales solo se detecta molecularmente el reordenamiento PML-RAR α , tienen el mismo pronóstico favorable que aquellos que se identifican citogenéticamente por la presencia de la translocación. Esto constituye otra razón muy importante para indicar el estudio molecular en los pacientes cuya morfología haga sospechar una LAP.⁶

La paciente nuestra con la t(11;17) no respondió al tratamiento con ATRA y el otro caso con resultados negativos para el PML-RAR α tampoco. Aunque no se pudo comprobar la presencia de la t(11;17), es muy probable que este paciente, por su comportamiento clínico, también fuera portador de esta variante.

La técnica molecular no solo es más rápida (se puede tener el resultado en un día), sino que permite detectar siempre la presencia del gen híbrido y además contar con un marcador con una gran sensibilidad para confirmar la remisión y realizar el monitoreo de la enfermedad mínima residual durante el seguimiento de los pacientes. También permite tener una conformación objetiva de la remisión morfológica, lo que posibilita distinguir entre la regeneración medular y la persistencia de la enfermedad, que puede ser particularmente problemática en este subtipo de LMA.^{14,15}

Los resultados preliminares obtenidos en este trabajo han confirmado la importancia práctica en el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad, ya que todos los pacientes con resultados positivos respondieron al ATRA y alcanzaron la remisión, mientras que los 2 casos con resultados negativos no lo hicieron.

Por otra parte, también se comprobó la importancia en el diagnóstico diferencial en casos con morfología dudosa al

demostrar la presencia del reordenamiento PML-RAR α en el paciente que se manifestaba morfológicamente como M3-M4.

La frecuencia obtenida de los 3 puntos de ruptura coincide con la descrita en la literatura, es decir, el bcr 1 es el más frecuente, le sigue el bcr 3 y el bcr 2 es muy poco frecuente.

El objetivo nuestro en este trabajo fue estandarizar la técnica en nuestro laboratorio y comprobar su importancia en el diagnóstico de los pacientes con LAP. En estos momentos estamos realizando el monitoreo molecular para detectar la enfermedad mínima residual durante el seguimiento de estos pacientes. Los resultados obtenidos serán presentados en otro trabajo.

SUMMARY

Acute promyelocytic leukemia (APL) is characterized by the reciprocal translocation t(15; 17) that results in fusion gene PML-RAR α formation. As APL is considered to be an hematological emergency and also is given a very specific treatment with retinoic acid (ATRA), then it is very important to diagnose quickly and accurately which makes it possible in many cases to save the patient's life. At present RT-PCR methods have been developed to detect PML-RAR α gen. These molecular techniques have been extremely useful in diagnosing this entity. This paper sets forth the preliminary results of molecular diagnoses of APL in 38 patients. 36 cases presented the fusion gene and 2 did not. Of the total number of positive patients, 19(55%) were bcr 1, 2 (5%) were bcr 2 and 14(40%) bcr 3. All the patients with positive results were responsive to treatment with ATRA. One of the two patients with negative results showed the existence of t(11; 17). These two patients did not respond to treatment with ATRA.

Subject headings: LEUKEMIA, PROMYELOCYTIC, ACUTE/diagnosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of acute leukemias. Br J Haematol 1976;33:451-8.
2. Stone RM, Mayer RJ. The unique aspects of acute promyelocytic leukemia. J Clin Oncol 1990;8:1913-21.
3. Biondi A, Rovelli A, Cantu-Rajnoaldi A, Fenu S, Basso G, Luciano A. et al. Acute promyelocytic leukemia in children: experience of the Italian Pediatric Hematology and Oncology Group (AIEOP). Leukemia 1994;8:1264-8.
4. Dower D, Preston-Martin S, Chang E, Nichols PW, Watkins KJ, Levine AM. High frequency of acute promyelocytic leukemia among latinos with AML. Blood 1996;87:308-13.
5. Grimwade D. The pathogenesis of acute promyelocytic leukemia: evaluation of the role of molecular diagnosis and monitoring in the management of the disease. Br J Haematol 1999;106:591-613.
6. Lo Coco F, Diverio D, Falini B, Biondi A, Nervi C, Pelicci PG. Genetic diagnosis and molecular monitoring in the management of acute promyelocytic leukemia. Blood 1999;94:12-22.
7. Castagne S, Balitrand N, The H de, Dejean A, Degos L, Chomienne C. A PML/retinoic acid receptor a is constantly detected by RNA-based polymerase chain reaction in acute promyelocytic leukemia. Blood 1992;79:3110-5.
8. Biondi A, Rambaldi A, Pandolfi Pp, Rossi V, Giudici G, Alcalay M et al. Molecular monitoring of the myl/retinoic acid receptor fusion gene in acute promyelocytic leukemia by polymerase chain reaction. Blood 1992;80:492-7.
9. Liu Yin JA, Tobal K. Detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia: methodologies, clinical and biological significance. Br J Haematol 1999;106:578-90.

10. Miller WH Jr, Kaziuka A, Frankel ST, Warrell RP Jr, De-Blasio A, Levine K, et al. Reverse transcriptase polymerase chain reaction for the rearranged retinoic acid receptor alpha clarifies diagnosis and detects minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2694-8.
11. Bennet JM, Catovsky, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann Intern Med* 1985;103:626-9.
12. Dongen van, JJM Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted action: Investigation for minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999 (en prensa).
13. Chen SJ, Zelent A, Tong JH, Yu HQ, Wang ZY, Derre J, et al. Rearrangement of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic zinc finger genes resulting from t(11;17) (q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia. *J Clin Invest* 1993;91:2260-7.
14. Diverio D, Rossi V, Avvisati G, De Santis S, Pistilli A, Pane F, et al. Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of the PML- RARa fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter AIDA trial. *Blood* 1998;92:784-9.
15. Lo Coco F, Nervi C, Avvisati G, Mandelli F. Acute promyelocytic leukemia: (a curable.) *Leukemia* 1998;12:1866-80.

Recibido: 24 de enero del 2000. Aprobado. 28 de enero del 2000.

Dra. *Gisela Martínez Antuña*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf: (537) 578268. Fax: (537) 338979. e-mail:ihidir@hemato-sld.cu